

ROL DE LAS PLAQUETAS EN LA INFLAMACIÓN

Rol de las plaquetas en el microambiente inflamatorio

Dra. Julia Etulain¹ y Dra. Mirta Schattner²

Laboratorio de Trombosis Experimental. IMEX-CONICET, ANM.

En condiciones fisiológicas, la activación de las plaquetas circulantes es limitada de manera constitutiva a través de la liberación, a partir del endotelio vascular, de potentes inhibidores de la función plaquetaria tales como el óxido nítrico y prostaciclina ^[1]. Frente a una injuria vascular, las plaquetas se adhieren firmemente a proteínas expuestas del subendotelio permitiendo la formación del trombo y la detención de la hemorragia. Sin embargo, durante las últimas dos décadas numerosas evidencias revelaron que, además, en ausencia de un aparente daño morfológico pero en situaciones inflamatorias, las plaquetas son capaces de interactuar con el endotelio debido tanto a la disminución de los mecanismos fisiológicos inhibitorios como a un aumento en la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales activadas ^[2]. Estos descubrimientos no sólo han creado un nuevo paradigma en la biología vascular sino también han abierto un novedoso y extenso campo de estudio asociado a las consecuencias fisio-patológicas de la interacción entre las plaquetas y el endotelio.

Desde un punto de vista evolutivo, las plaquetas están íntimamente vinculadas a los hemocitos de los artrópodos, células nucleadas responsables de la inmunidad y la coagulación en dichos organismos. En las especies de orden superior estas funciones han divergido en células más especializadas, en donde las plaquetas han retenido algunas de las características de la inmunidad innata, en particular, su capacidad para cooperar con los neutrófilos y monocitos en la iniciación, progresión y resolución de la inflamación ^[3]. En este contexto, las plaquetas no sólo poseen todas las moléculas de adhesión celular y citoquinas necesarias para interactuar y activar a los leucocitos, sino que también tienen la maquinaria para reconocer y presentar agentes patógenos a las células efectoras como los receptores tipo Toll (TLRs) ^[4]. Además, expresan todos los componentes del complejo transcripcional NF- κ B, vía responsable de la transcripción de los principales genes que codifican moléculas pro-inflamatorias en células nucleadas ^[5]. En conjunto, la extensa evidencia clínica y experimental indica que las plaquetas juegan un rol clave en la inflamación.

La adhesión de las plaquetas al endotelio activado es coordinada por una secuencia de eventos que involucra la captura inicial de las plaquetas seguido por el rodamiento y la adhesión firme de estas células. Durante estos pasos secuenciales, las plaquetas se activan y liberan el contenido de sus gránulos alfa que contienen un gran arsenal de sustancias pro-inflamatorias, incluyendo moléculas de membrana expresadas en la superficie celular como así también quemoquinas y citoquinas secretadas al medio extracelular, ^[6] las cuales promueven el cambio hacia un fenotipo endotelial inflamatorio y favorecen el reclutamiento y la activación de los leucocitos, evento fundamental en la

¹ Becaria Postdoctoral CONICET, juliaetulain@hotmail.com

² Investigadora Principal CONICET, mschattner@hematologia.anm.edu.ar

respuesta inflamatoria [7]. De manera similar al proceso de adhesión de las plaquetas, la interacción entre leucocitos y la pared vascular es coordinada por una secuencia de eventos que comprenden la captura inicial de los leucocitos seguido por el rodamiento, activación, adhesión y transmigración de estas células a través del endotelio [8]. Si bien los leucocitos son capaces de interactuar de manera directa con el endotelio, este proceso es favorecido por las plaquetas adheridas a la pared vascular ya que las plaquetas actúan como puente en la interacción entre ambas células; promueven la activación bidireccional de leucocitos y células endoteliales y la migración hacia la íntima del vaso [3].

Asimismo, el fenotipo plaquetario también es drásticamente alterado durante la respuesta inflamatoria. En este sentido y si bien la activación de las plaquetas resulta en una respuesta pro-trombótica, trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que en condiciones de acidosis, característica común del microambiente inflamatorio, ocurre el desacople de las funciones hemostáticas e inflamatorias de las plaquetas [9, 10]. En particular, mientras la agregación plaquetaria, la actividad pro-coagulante y la liberación de mediadores pro-trombóticos, incluyendo tromboxano A₂ y factor von Willebrand, están drásticamente inhibidas por el descenso del pH, respuestas inflamatorias como la formación de agregados mixtos plaqueta-leucocito, la adhesión, migración y sobrevida de leucocitos mediada por plaquetas están significativamente incrementadas en un medio ácido. Este aumento en las respuestas inflamatorias de las plaquetas son mediadas por una mayor expresión de P-selectina en las plaquetas [9, 10]. En condiciones de reposo, la plaqueta no expresa P-selectina, sin embargo como consecuencia de la activación plaquetaria, la P-selectina, normalmente depositada en los gránulos alfa, es expuesta en la membrana plaquetaria. La P-selectina se une ávidamente a su ligando, el PSGL-1, expresado constitutivamente en células endoteliales y en los leucocitos permitiendo de esta manera un íntimo contacto entre estos tipos celulares [9, 10]. A nivel molecular, determinamos que el aumento de las respuestas inflamatorias mediadas por las plaquetas en acidosis es gatillado por la activación conjunta de p38 y del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) [9]. Si bien el NF-κB, en células nucleadas dirige la transcripción de múltiples genes pro-inflamatorios, en las plaquetas anucleadas nuestro grupo de trabajo describió que la activación de esta vía cumple un rol no genómico ya que participa en la respuesta de activación plaquetaria [5].

Por otro lado y de manera similar a lo que ocurre en las células nucleadas, la señalización mediada por NF-κB en plaquetas no solamente es gatillada por agonistas clásicos sino también por la unión de componentes bacterianos a los TLRs expresados en la superficie plaquetaria [4]. La participación de los TLRs plaquetarios en la inmunidad innata ha sido puesta de manifiesto recientemente en el descubrimiento de las trampas extracelulares de ADN (o del inglés, NETs) derivadas del neutrófilo. Este fenómeno es un novedoso mecanismo de fagocitosis y muerte celular a través del cual los neutrófilos luego de su activación expelen al medio extracelular su contenido de ADN principalmente histonas y proteínas microbidas que atrapan y matan a los patógenos incluyendo bacterias, hongos, parásitos y virus [11]. En sepsis causada por *E. coli*, la unión del lipopolisacárido (LPS) (componente de la pared celular de las bacterias Gram (-)) al TLR-4 constitutivamente expresado en la superficie plaquetaria es un evento crítico en la formación de NETs. De hecho, en ratones deplecionados de plaquetas ocurre una diseminación bacteriana especialmente en pulmón e hígado, no observada en ratones infectados pero con plaquetas normales [11]. Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio demostraron que la formación de NETs mediada por plaquetas en presencia de componentes bacterianos, además de ocurrir a través de la unión LPS/TLR-4, también es un fenómeno extensivo a las bacterias Gram (+) involucrando la activación del TLR-2 plaquetario [12]. Más aún, y de manera similar a lo observado para otras respuestas

inflamatorias mediadas por estas células anucleadas, la formación de NETs es significativamente aumentada en acidosis ^[12]. Además, recientemente se ha demostrado que la NETosis inducida por plaquetas también es inducida durante la respuesta inflamatoria estéril, a través de la activación de plaquetas por agonistas fisiológicos como el adenosin-difosfato o colágeno, a través de un mecanismo dependiente de la expresión del HMGB-1 (del inglés, High-mobility group protein B1) en la superficie plaquetaria y de autofagia en el neutrófilo ^[13]. Más aún, la interacción plaquetas-endotelio-neutrófilos con la consecuente formación de NETs es considerada un mecanismo patogénico de la trombosis venosa ^[14].

INTERACCIÓN PLAQUETA-LEUCOCITO-ENDOTELIO, UN ARMA DE DOBLE FILO

En general, la amplificación de la activación leucocitaria mediada por las plaquetas juega un papel positivo o beneficioso, favoreciendo los mecanismos inflamatorios e inmunes de defensa contra patógenos. Sin embargo, una falla en la regulación de los mismos puede desencadenar una respuesta inflamatoria exacerbada, contribuyendo a una inflamación vascular persistente la cual está involucrada en la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias crónicas.

Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad crónica caracterizada por la progresiva infiltración de células inmunes al subendotelio de las arterias, la formación de una estría grasa y el desarrollo de la placa de ateroma. Ante la persistencia de los factores de riesgo, la placa es desestabilizada y eventualmente sufre una ruptura, ocasionando la liberación del contenido pro-inflamatorio y pro-trombótico de la placa ateromatosa hacia el torrente sanguíneo, ocasionando la formación de trombos oclusivos causantes del accidente cerebro- y -cardiovascular ^[15].

Si bien durante décadas la hipercolesterolemia y la acumulación de lípidos eran considerados los mayores factores de riesgo asociados a la patogénesis de la aterosclerosis, en la actualidad se sabe que esta patología es un proceso inflamatorio crónico causado por múltiples factores ^[15]. Dentro de estos factores y desde el punto de vista clínico, la eficacia de las terapias anti-agregantes en la prevención secundaria de eventos cardiovasculares es una clara evidencia del rol de las plaquetas en la patogénesis de la aterosclerosis ^[6]. Las plaquetas contribuyen activamente a la iniciación y progresión de esta enfermedad a través de la interacción bidireccional con leucocitos y células endoteliales ^[6,16]. Las plaquetas activadas, de manera individual o formando agregados mixtos con los leucocitos, se adhieren al endotelio vascular en sitios propensos a la formación de la placa de ateroma (bifurcaciones de los vasos) liberando localmente un gran arsenal de quemoquinas, las cuales amplifican la transmigración de monocitos y otras células mononucleares hacia la íntima arterial ^[6]. Además de la liberación de sustancias pro-inflamatorias, las plaquetas expresan los receptores funcionales de dichas quemoquinas ^[17, 18]. Si bien el rol de estos receptores en la modulación de la aterogénesis mediada por plaquetas no ha sido completamente dilucidado, recientemente se ha demostrado que la expresión de CX₃CR1 (también conocido como receptor de fractalquina) es aumentada en la superficie de las plaquetas provenientes de ratones hiperlipidémicos, y que dicho fenómeno promueve la formación de agregados mixtos plaqueta-monocitos y la acumulación de monocitos en la íntima arterial ^[18]. Estos datos sugieren que las sustancias liberadas por las plaquetas ejercen un efecto autócrino y parácrino sobre todas las células vasculares involucradas en la etapa temprana de esta

patología. Luego del reclutamiento de los monocitos hacia la íntima, tanto la diferenciación de estas células a macrófagos ^[19], como así también el reclutamiento y diferenciación de progenitores hematopoyéticos (CD34+) a células espumosas ^[20, 21] son promovidos por las plaquetas. Teniendo en cuenta que estos procesos están íntimamente asociados a la iniciación y progresión de la aterosclerosis, estas evidencias destacan la necesidad de evaluar la eficacia clínica de estrategias anti-plaquetarias a largo plazo para la prevención primaria de eventos cardiovasculares.

Las plaquetas también participan activamente en los eventos trombóticos ocasionados luego de la ruptura de la placa de ateroma ^[22]. Hasta hace poco se creía que la formación de trombos estaba únicamente asociada a la activación de las plaquetas como primordiales efectores celulares de esta respuesta biológica. Sin embargo, estudios recientes han demostrado por un lado que las NETs se encuentran presentes en las lesiones ateroscleróticas ^[23], y por el otro, que los componentes derivados de estas estructuras promueven la formación de trombos a través de la inducción de la activación plaquetaria y de la formación de fibrina ^[24, 25]. Estas evidencias indican que además de las plaquetas, los neutrófilos podrían promover significativamente el desarrollo de los eventos trombóticos asociados a la aterosclerosis. Además, se ha descripto que las defensinas e histonas provenientes de las NETs causan daño y disfunción endotelial a través de la inducción de la muerte de las células endoteliales ^[26]. Por lo tanto, es concebible que la activación o incluso la apoptosis de los diferentes tipos de células de la placa de ateroma mediada por las NETs, podría ser uno de los novedosos mecanismos del desarrollo y la progresión de la aterosclerosis. Estas evidencias sugieren que los neutrófilos, hasta ahora ignorados en el contexto de esta patología, podrían llegar a jugar un rol clave en la patogénesis de dicha enfermedad ^[27]. La interacción entre las plaquetas y los neutrófilos en este particular foco inflamatorio aún no ha sido dilucidada.

Sepsis

Probablemente el mejor ejemplo de la contribución de las plaquetas a la respuesta inflamatoria sea la sepsis y la falla multiorgánica. Durante una inflamación sistémica causada por la infección bacteriana, las plaquetas circulan expresando P-selectina en la superficie celular, evento que promueve la formación de agregados mixtos plaqueta-leucocito circulantes ^[28]. La adhesión de las plaquetas activadas dentro de la microvasculatura, junto con la formación de agregados plaquetarios, contribuyen a la hiperpermeabilidad y a la hipoperfusión vascular observada en el transcurso de una sepsis, fenómenos que conducen a la pérdida en la integridad de la pared vascular, como así también a la oclusión de la microvasculatura que irriga a los órganos ^[29]. Como se mencionó previamente, la formación de NETs mediada por plaquetas es considerada actualmente otro mecanismo celular que contribuye a la patogénesis de esta enfermedad. Si bien las NETs juegan un rol beneficioso en sepsis favoreciendo la eliminación de patógenos ^[12, 30], la producción exacerbada de las mismas causa daño y disfunción endotelial, los cuales podrían contribuir al daño tisular durante la sepsis ^[31].

Artritis

La artritis reumatoidea es un desorden inflamatorio autoinmune que típicamente afecta las articulaciones sinoviales de las manos y pies ^[32]. La relación entre la activación plaquetaria y la artritis reumatoidea ha sido demostrada en diversos estudios, identificando a las micropartículas derivadas de las plaquetas (MPPs), pequeñas vesículas de membrana, como los principales mediadores involucrados en la patogénesis de este proceso ^[33]. La inflamación crónica característica de esta patología es amplificada por las MPPs, las cuales promueven la activación de fibroblastos sinoviales en un

mecanismo dependiente de IL-1 α y -1 β ^[34]. Si bien los mecanismos que modulan la formación de MPPs en el contexto de la artritis no han sido completamente elucidados, fue demostrado que las MPPs son liberadas luego de la activación plaquetaria, la cual es inducida por la interacción de la glicoproteína VI (GPVI) expresada en la superficie plaquetaria con el colágeno depositado anómalamente en los sinovios de las articulaciones ^[34]. Estudios más recientes han demostrado que a nivel molecular, las vías de señalización gatilladas a través de la unión colágeno/GPVI involucran la activación solapada del receptor del tipo lectina C-2 (del inglés, CLEC-2) ^[35, 36]. Sin embargo, y en contraposición al rol negativo de las plaquetas en la artritis reumatoidea, en un modelo porcino ha sido demostrado que la inyección intra-articular de plasma rico en plaquetas atenúa la degeneración morfológica de sinovios y cartílagos característica de esta enfermedad ^[37]. En conjunto, estos resultados demuestran que si bien las plaquetas participan en la fisio-patogénesis de la artritis reumatoidea, el correlato funcional beneficioso o negativo de dicha contribución aún requiere ser estudiada.

Enfermedades pulmonares

El papel de las plaquetas en el inicio de la lesión pulmonar en diversas patologías pulmonares inflamatorias ha sido corroborado en modelos de aspiración ácida y lesión pulmonar aguda inducida por sepsis, en los cuales la infiltración de neutrófilos es reducida luego de la depleción de plaquetas ^[38]. En estas patologías, la interacción entre las plaquetas y los leucocitos entre sí o con el endotelio pulmonar activado es principalmente mediada por la expresión de P-selectina incrementada en la superficie plaquetaria ^[38, 39]. También se ha observado que, la extravasación de los neutrófilos al pulmón inducida por LPS o sepsis es disminuida por el bloqueo de los receptores de las quemoquinas liberadas por las plaquetas ^[40]. Además, se ha demostrado que la generación de NETs, en procesos inflamatorios no infecciosos o estériles, está vinculada a la patogénesis de la fibrosis quística y de la injuria pulmonar asociada a transfusiones ^[41]. En estos modelos de injuria pulmonar estéril, la formación de NETs en los pulmones es disminuida por el bloqueo farmacológico de la activación plaquetaria ^[42] o por la depleción sistémica de estas células ^[43]. La presencia de agregados mixtos plaqueta-leucocito circulantes es detectada en pacientes con asma, fibrosis quística e injuria endotelial ^[38, 44].

Enfermedades inflamatorias intestinales (EII)

Las dos patologías más comunes dentro de las EII son la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Si bien el desarrollo de tromboembolismos es una de las causas de muerte más relevantes en los pacientes con EII, este fenómeno no es explicado en su totalidad por los factores genéticos asociados al riesgo de trombosis venosa en los pacientes con EC y CU ^[45]. Los nuevos enfoques asociados a estas patologías han sugerido que, más allá de los riesgos genéticos, las anomalías en la coagulación observadas en estos pacientes son el resultado de la participación de diversas células y citoquinas inflamatorias ^[45]. Una característica de los pacientes con EII es la presencia de agregados plaquetarios homotípicos y heterotípicos (plaquetas-leucocitos), ya sea circulantes en la sangre ^[46, 47], depositados en las vénulas postcapilares del colon inflamado ^[48] o en los fluidos de las secreciones intestinales ^[49]. Los primeros estudios sobre este tema describieron que este proceso, junto con la consecuente disfunción de la barrera endotelial, estaba principalmente mediada por la interacción del CD40L derivado de las plaquetas activadas, con el CD40 constitutivamente expresado en la superficie de leucocitos y endotelio ^[50]. Sin embargo, un estudio más reciente ha demostrado que la activación plaquetaria y la formación de agregados mixtos plaqueta-leucocito inducida en un modelo de inflamación de colon murino, es reducida en ratones deficientes de IL-6,

demostrando así la participación relevante de otras sustancias inflamatorias en este proceso ^[51]. Teniendo en cuenta el papel activo de las plaquetas en las EII, se ha sugerido la determinación de marcadores plaquetarios, incluyendo recuento celular sanguíneo o volumen plaquetario medio, como biomarcadores de monitoreo y diagnóstico de las enfermedades intestinales crónicas ^[52]. Sin embargo, otros autores han señalado la ausencia de correlación entre los parámetros plaquetarios con los síntomas clínicos de estas patologías ^[53]. A la luz de las controversias, más estudios sobre este tema serán necesarios a futuro.

Conclusiones

Las células sanguíneas circulantes son percibidas cada vez más como mediadores críticos de la inflamación vascular crónica. El diálogo cruzado entre las plaquetas, los leucocitos y las células endoteliales en el microambiente inflamatorio conforman un arma de doble filo, favoreciendo por un lado los mecanismos inflamatorios e inmunes de defensa contra patógenos, pero contribuyendo por el otro a la inflamación vascular persistente, la cual puede conducir patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias crónicas.

El mecanismo molecular implicado en la activación recíproca de las plaquetas, los leucocitos y el endotelio no ha sido completamente dilucidado. La regulación fina de las interacciones entre dichas células se ha convertido en un novedoso campo de estudio, el cual permitirá aplicar nuevas estrategias terapéuticas para modular la inflamación vascular con mayor eficiencia, y menos efectos adversos, comparado con los métodos actualmente empleados.

La era de la genómica y la proteómica ha sido recientemente introducida en la investigación de las plaquetas, y seguirá ofreciendo importantes herramientas para ayudar a entender el papel patológico de las plaquetas en el curso de la inflamación.

Debido a que las enfermedades inflamatorias son una causa considerable de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados, la comprensión de la interacción de sus actores más importantes es un reto significativo. A la luz de los datos existentes, diversos mediadores plaquetarios adhesivos y solubles se han convertido en el blanco de prometedoras estrategias terapéuticas en las enfermedades inflamatorias. Los posibles efectos adversos de estos enfoques tienen que ser cuidadosamente dirigidos y supervisados, incluyendo no sólo posibles alteraciones en la hemostasia y la coagulación, sino también la interferencia con la respuesta inflamatoria involucrada en la eliminación de patógenos.

Bibliografía

1. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
2. Tabuchi, A. and W.M. Kuebler, *Endothelium-platelet interactions in inflammatory lung disease*. Vascul Pharmacol, 2008. **49**(4-6): p. 141-50.
3. Morrell, C.N., et al., *Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells*. Blood, 2014. **123**(18): p. 2759-67.
4. Rivadeneyra, L., et al., *Regulation of platelet responses triggered by Toll-like receptor 2 and 4 ligands is another non-genomic role of nuclear factor-kappaB*. Thromb Res, 2014. **133**(2): p. 235-43.

5. Malaver, E., et al., *NF-kappaB inhibitors impair platelet activation responses*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(8): p. 1333-43.
6. von Hundelshausen, P. and M.M. Schmitt, *Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 294.
7. von Hundelshausen, P., R.R. Koenen, and C. Weber, *Platelet-mediated enhancement of leukocyte adhesion*. Microcirculation, 2009. **16**(1): p. 84-96.
8. van Gils, J.M., J.J. Zwaginga, and P.L. Hordijk, *Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(2): p. 195-204.
9. Etulain, J., et al., *Mecanismos moleculares involucrados en las respuestas inflamatorias mediadas por plaquetas en acidosis*. Hematología (Journal of the Argentinian Society of Haematology), 2013. **17**(1): p. 15-20.
10. Etulain, J., et al., *Acidosis downregulates platelet haemostatic functions and promotes neutrophil proinflammatory responses mediated by platelets*. Thromb Haemost, 2012. **107**(1): p. 99-110.
11. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 463-9.
12. Carestia, A., et al., *Las plaquetas potencian la formación de trampas extracelulares de ADN (NETs)*. Medicina Buenos Aires, 2014. **74**(3): p. 215.
13. Maugeri, N., et al., *Activated platelets present High Mobility Group Box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps*. J Thromb Haemost, 2014.
14. Martinod, K. and D.D. Wagner, *Thrombosis: tangled up in NETs*. Blood, 2014. **123**(18): p. 2768-76.
15. Zerneck, A. and C. Weber, *Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(4): p. 742-50.
16. Massberg, S., et al., *A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation*. J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 887-96.
17. Clemetson, K.J., et al., *Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4046-54.
18. Postea, O., et al., *Contribution of platelet CX(3)CR1 to platelet-monocyte complex formation and vascular recruitment during hyperlipidemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(5): p. 1186-93.
19. Ammon, C., et al., *Platelets induce monocyte differentiation in serum-free coculture*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(4): p. 469-76.
20. Daub, K., et al., *Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells*. FASEB J, 2006. **20**(14): p. 2559-61.
21. Massberg, S., et al., *Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1221-33.
22. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(23): p. 2129-38.
23. Megens, R.T., et al., *Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2012. **107**(3): p. 597-8.
24. Horn, M., et al., *Human neutrophil alpha-defensins induce formation of fibrinogen and thrombospondin-1 amyloid-like structures and activate platelets via glycoprotein IIb/IIIa*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(4): p. 647-61.

25. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15880-5.
26. Saffarzadeh, M., et al., *Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32366.
27. Gomes Quindere, A.L., et al., *Update on selective treatments targeting neutrophilic inflammation in atherogenesis and atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2014. **111**(4): p. 634-46.
28. Gawaz, M., et al., *Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure*. Eur J Clin Invest, 1995. **25**(11): p. 843-51.
29. Tymk, K., *Critical role for oxidative stress, platelets, and coagulation in capillary blood flow impairment in sepsis*. Microcirculation, 2011. **18**(2): p. 152-62.
30. Lapponi, M.J., et al., *Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs*. J Pharmacol Exp Ther, 2013. **345**(3): p. 430-7.
31. Liu, F.C., et al., *Role of neutrophil extracellular traps following injury*. Shock, 2014. **41**(6): p. 491-8.
32. Burmester, G.R., E. Feist, and T. Dorner, *Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(2): p. 77-88.
33. Gasparyan, A.Y., et al., *Platelets in rheumatic diseases: friend or foe?* Curr Pharm Des, 2014. **20**(4): p. 552-66.
34. Boilard, E., et al., *Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production*. Science, 2010. **327**(5965): p. 580-3.
35. Hsu, J., et al., *Bruton's Tyrosine Kinase mediates platelet receptor-induced generation of microparticles: a potential mechanism for amplification of inflammatory responses in rheumatoid arthritis synovial joints*. Immunol Lett, 2013. **150**(1-2): p. 97-104.
36. Gitz, E., et al., *CLEC-2 expression is maintained on activated platelets and on platelet microparticles*. Blood, 2014. **124**(14): p. 2262-70.
37. Lippross, S., et al., *Intraarticular injection of platelet-rich plasma reduces inflammation in a pig model of rheumatoid arthritis of the knee joint*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(11): p. 3344-53.
38. Zarbock, A., K. Singbartl, and K. Ley, *Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation*. J Clin Invest, 2006. **116**(12): p. 3211-9.
39. Pitchford, S.C., et al., *Platelet P-selectin is required for pulmonary eosinophil and lymphocyte recruitment in a murine model of allergic inflammation*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2074-81.
40. Grommes, J., et al., *Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **185**(6): p. 628-36.
41. Young, R.L., et al., *Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of Pseudomonas aeruginosa: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e23637.
42. Caudrillier, A., et al., *Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury*. J Clin Invest, 2012. **122**(7): p. 2661-71.
43. Rossaint, J., et al., *Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation*. Blood, 2014. **123**(16): p. 2573-84.
44. Sturm, A., et al., *Platelet proinflammatory activity in clinically stable patients with CF starts in early childhood*. J Cyst Fibros, 2010. **9**(3): p. 179-86.

45. Magro, F., J.B. Soares, and D. Fernandes, *Venous thrombosis and prothrombotic factors in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(17): p. 4857-72.
46. Andoh, A., et al., *Increased aggregation response of platelets in patients with inflammatory bowel disease*. J Gastroenterol, 2006. **41**(1): p. 47-54.
47. Pamuk, G.E., et al., *Increased circulating platelet-neutrophil, platelet-monocyte complexes, and platelet activation in patients with ulcerative colitis: a comparative study*. Am J Hematol, 2006. **81**(10): p. 753-9.
48. Vowinkel, T., et al., *Mechanisms of platelet and leukocyte recruitment in experimental colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(5): p. G1054-60.
49. Weissmuller, T., et al., *PMNs facilitate translocation of platelets across human and mouse epithelium and together alter fluid homeostasis via epithelial cell-expressed ecto-NTPDases*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3682-92.
50. Vowinkel, T., et al., *CD40-CD40 ligand mediates the recruitment of leukocytes and platelets in the inflamed murine colon*. Gastroenterology, 2007. **132**(3): p. 955-65.
51. Yan, S.L., J. Russell, and D.N. Granger, *Platelet activation and platelet-leukocyte aggregation elicited in experimental colitis are mediated by interleukin-6*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(2): p. 353-62.
52. Ozturk, Z.A., et al., *Could platelet indices be new biomarkers for inflammatory bowel diseases?* Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013. **17**(3): p. 334-41.
53. Yalcinkaya, E., M. Celik, and B. Bugan, *Platelet indices should not be considered a stand-alone test for monitoring the disease progression*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013. **17**(19): p. 2693.